

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2003-289868

(43)Date of publication of application : 14.10.2003

(51)Int.Cl.

C12N 15/09
C07K 14/195
C12J 1/00
C12N 1/21

(21)Application number : 2002-098770

(71)Applicant : MITSUKAN GROUP HONSHA:KK

(22)Date of filing : 01.04.2002

(72)Inventor : NAKANO SHIGERU

(54) ACETIC ACID RESISTANCE GENE, ACETOBACTER BRED BY USING THE GENE AND METHOD FOR PRODUCING VINEGAR BY USING THE ACETOBACTER

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a new acetic acid resistance gene associated with the acetic acid resistance, a microorganism containing the gene, and to provide a method for producing vinegar having a high concentration of acetic acid by using the microorganism.

SOLUTION: A protein having the acetic acid resistance and having a specific amino acid sequence, the DNA encoding the protein, the microorganism containing the DNA, and the method for producing the vinegar having the high concentration of acetic acid by using the microorganism are provided.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 29.03.2005

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

[MENU](#)

[SEARCH](#)

[INDEX](#)

[DETAIL](#)

[JAPANESE](#)

1 / 1

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2003-289868
(P2003-289868A)

(43) 公開日 平成15年10月14日 (2003. 10. 14)

| (51) Int.Cl. ⁷ | 識別記号 | F I | テマコード [*] (参考) |
|---------------------------|-------|----------------|-------------------------|
| C 1 2 N 15/09 | Z N A | C 0 7 K 14/195 | 4 B 0 2 4 |
| C 0 7 K 14/195 | | C 1 2 J 1/00 | Z 4 B 0 2 8 |
| C 1 2 J 1/00 | | C 1 2 N 1/21 | 4 B 0 6 5 |
| C 1 2 N 1/21 | | 15/00 | Z N A A 4 H 0 4 5 |

審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 20 頁)

(21) 出願番号 特願2002-98770 (P2002-98770)

(22) 出願日 平成14年4月1日 (2002. 4. 1)

(71) 出願人 398065531

株式会社ミツカングループ本社
愛知県半田市中村町2丁目6番地

(72) 発明者 中野 繁

愛知県知多郡阿久比町卯坂字坂部28

(74) 代理人 100091096

弁理士 平木 祐輔 (外2名)

Fターム (参考) 4B024 AA05 BA77 BA80 CA01 DA05
GA11 GA19 HA20

4B028 BC07 BC10 BL22 BP12 BX10

4B065 AA02X AA02Y AB01 AC14

BA02 BB06 BC15 CA10 CA42

4H045 AA10 BA10 CA11 EA01 FA74

(54) 【発明の名称】 酢酸耐性遺伝子、該遺伝子を用いて育種された酢酸菌、及び該酢酸菌を用いた食酢の製造方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 酢酸耐性に関与する新規な酢酸耐性遺伝子を提供すること、及び該遺伝子を含む微生物並びに該微生物を用いて高酢酸濃度の食酢を効率良く製造する方法を提供すること

【解決手段】 特定のアミノ酸配列を有する酢酸耐性を有する蛋白質、これら蛋白質をコードするDNA、これらDNAを含む微生物及びこれら微生物を用いた高酢酸濃度の食酢の製造法。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 以下の (a) 又は (b) のタンパク質。

(a) 配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(b) 配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、酢酸耐性を有するタンパク質。

【請求項 2】 以下の (a) 又は (b) のタンパク質。

(a) 配列表の配列番号 4 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(b) 配列表の配列番号 4 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、酢酸耐性を有するタンパク質。

【請求項 3】 以下の (a) 又は (b) のタンパク質をコードする DNA。

(a) 配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(b) 配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、酢酸耐性を有するタンパク質。

【請求項 4】 以下の (a) 又は (b) のタンパク質をコードする DNA。

(a) 配列表の配列番号 4 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(b) 配列表の配列番号 4 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、酢酸耐性を有するタンパク質。

【請求項 5】 以下の (a) 又は (b) の塩基配列からなる DNA。

(a) 配列番号 1 に記載の塩基配列のうち、塩基番号 301～2073 からなる DNA。

(b) 配列番号 1 に記載の塩基配列のうち、塩基番号 301～2073 からなる塩基配列からなる DNA 又は該 DNA 配列の一部と相補的な塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、酢酸耐性を有するタンパク質をコードする DNA。

【請求項 6】 以下の (a) 又は (b) の塩基配列からなる DNA。

(a) 配列番号 3 に記載の塩基配列のうち、塩基番号 331～2154 からなる DNA。

(b) 配列番号 3 に記載の塩基配列のうち、塩基番号 331～2154 からなる塩基配列からなる DNA 又は該 DNA 配列の一部と相補的な塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、酢酸耐性を有するタンパク質をコードする DNA。

【請求項 7】 請求項 3、4、5 又は 6 に記載の DNA

を細胞内に含む酢酸耐性を有する微生物又は前記酢酸耐性を有しかつその耐性が増強された微生物。

【請求項 8】 微生物がアセトバクター属、又はグルコンアセトバクター属の酢酸菌であることを特徴とする請求項 7 に記載の微生物。

【請求項 9】 請求項 7 又は 8 に記載の微生物を、アルコールを含有する培地で培養して該培地中に酢酸を生成蓄積せしめることを特徴とする食酢の製造方法。

【0001】

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、微生物に由来する酢酸耐性を増強する機能を有するタンパク質をコードする遺伝子、該遺伝子を含む微生物、特にアセトバクター属 (Acetobacter) 及びグルコンアセトバクター属 (Gluconacetobacter) に属する酢酸菌、及びこれらの微生物を用いて高濃度の酢酸を含有する食酢を効率良く製造する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 酢酸菌は食酢製造に広く利用されている微生物であり、特にアセトバクター属及びグルコンアセトバクター属に属する酢酸菌が工業的な酢酸発酵に利用されている。

【0003】 酢酸発酵では、培地中のエタノールが酢酸菌によって酸化されて酢酸に変換され、その結果、酢酸が培地中に蓄積することになるが、酢酸は酢酸菌にとっても阻害的であり、酢酸の蓄積量が增大して培地中の酢酸濃度が高くなるにつれて酢酸菌の増殖能力や発酵能力は次第に低下する。

【0004】 そのため、酢酸発酵においては、より高い酢酸濃度でも増殖能力や発酵能力が低下しないこと、すなわち酢酸耐性の強い酢酸菌を開発することが求められており、その一手段として、酢酸耐性に関与する酢酸耐性遺伝子 (Acetic acid resistance gene) をクローニングし、その酢酸耐性遺伝子を用いて酢酸菌を育種、改良することが試みられている。

【0005】 これまでの酢酸菌の酢酸耐性遺伝子に関する知見としては、アセトバクター属の酢酸菌の酢酸耐性を変異させて酢酸感受性にした株を元の耐性に回復させることのできる相補遺伝子として、クラスターを形成する 3 つの遺伝子 (a a r A、a a r B、a a r C) がクローニングされていた (ジャーナル・オブ・バクテリオロジー (J. Bacteriol.), 172 巻, 2096 頁, 1990 年)。

【0006】 この内、a a r A 遺伝子はクエン酸合成酵素をコードする遺伝子であり、又、a a r C 遺伝子は酢酸の資化に関係する酵素をコードする遺伝子であると推定されたが、a a r B 遺伝子については機能が不明であった (ジャーナル・オブ・フアーメンテーション・アンド・バイオエンジニアリング (J. Ferment. Bioen

g.), 76巻, 270頁, 1993年)。

【0007】これらの3つの酢酸耐性遺伝子を含む遺伝子断片をマルチコピープラスミドにクローニングし、アセトバクター・アセチ・サブスペシズ・ザイリナム IFO3288 (*Acetobacter aceti* subsp. *xylinum* IFO 3288) 株に形質転換して得られた形質転換株は、酢酸耐性の向上程度が僅かではなく、また実際の酢酸発酵で能力の向上の有無については不明であった(特開平3-219878号公報)。

【0008】一方、酢酸菌からクローニングされた膜結合型アルデヒド脱水素酵素(ALDH)をコードする遺伝子を酢酸菌に導入することによって、酢酸発酵において最終到達酢酸濃度の向上が認められた例が特開平2-2364号公報に開示されている。しかし、ALDHはアルデヒドを酸化する機能を有する酵素であって酢酸耐性に直接関係する酵素ではないことから、ALDHをコードする遺伝子が真に酢酸耐性遺伝子であるとは断定できないものであった。

【0009】このような実情から、酢酸耐性を実用レベルで向上させる機能を有するタンパク質をコードする新規な酢酸耐性遺伝子を取得し、また取得した酢酸耐性遺伝子を用いて、より強い酢酸耐性を有する酢酸菌を育種することが望まれていた。

【0010】

【発明が解決するための課題】本発明は、酢酸菌に属する微生物由来の酢酸耐性に関与する新規な酢酸耐性遺伝子を提供すること、及び該遺伝子を用いて微生物の酢酸耐性を向上させる方法、特に酢酸菌に属する微生物の酢酸耐性を向上させる方法、さらに酢酸耐性が向上した酢酸菌を用いて、より高酢酸濃度の食酢を効率良く製造する方法を提供することを課題とするものである。

【0011】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、酢酸存在下でも増殖し、発酵することができる酢酸菌には、他の微生物には存在しない特異的な酢酸耐性に関与する酢酸耐性遺伝子が存在するとの仮説を立て、こうした遺伝子を用いれば、従来以上に微生物の酢酸耐性を向上させることができ、さらには高濃度の酢酸を含有する食酢の効率的な製造法を開発することが可能になると考えた。

【0012】従来の酢酸耐性遺伝子の取得方法は、酢酸菌の酢酸感受性の変異株を相補する遺伝子をクローニングする方法などが一般的であった。

【0013】しかし、このような方法では産業上有用な酢酸耐性遺伝子を見出すことは困難であると考え、鋭意検討した結果、本発明者らは、酢酸菌から酢酸耐性遺伝子を見出す方法として、酢酸の存在下で特異的に発現しているタンパク質を検索し、そのタンパク質をコードする遺伝子を取得するといった、従来全く行われていなかった方法を開発した。

【0014】この方法によって、実際に食酢製造に用い

られているアセトバクター属とグルコンアセトバクター属に属する酢酸菌から、酢酸耐性を実用レベルで向上させる機能を有する新規な酢酸耐性遺伝子をクローニングすることに成功した。

05 【0015】得られた酢酸耐性遺伝子は、大腸菌などで見出されており、ATPバインディングカセット(ATP binding cassette)を有するABCトランスポーターと称される一群のタンパク質に共通する特徴的な塩基配列を有しており、酢酸菌のABCトランスポーターをコードする遺伝子(ABCトランスポーター遺伝子)であると推定された。

10 【0016】しかし、取得された酢酸菌の酢酸耐性遺伝子を、大腸菌などの他の微生物で見出されている既知のABCトランスポーター遺伝子と比較したところ、相同性がきわめて低かったことから、ATP結合部位を有する点では他のABCトランスポーター遺伝子と似ているものの該酢酸耐性遺伝子は酢酸菌に特異的な新規タンパク質をコードする新規遺伝子であることが判った。

15 【0017】一方、取得された酢酸耐性遺伝子について、食酢製造に使用されているアセトバクター属の酢酸菌由来のものとグルコンアセトバクター属の酢酸菌由来のもので比較したところ、両者の相同性は約70%であり、酢酸菌間での相同性は高かった。

20 【0018】さらに、取得された酢酸耐性遺伝子を用いた相同組換えによって該酢酸耐性遺伝子を破壊した酢酸菌は、酢酸に対する耐性が低下するが、類縁の各種有機酸に対する耐性はほとんど変化しなかったことから、該酢酸耐性遺伝子は酢酸に対する耐性に特異的に関与する遺伝子であることが明らかとなった。

25 【0019】また、該遺伝子をプラスミドベクターに連結して酢酸菌に形質転換してコピー数を増幅させた形質転換株においては、顕著に酢酸耐性が向上し、その結果、エタノール存在下で該形質転換株を通気培養した場合に、増殖誘導期が短縮する上に、増殖速度が向上し、35 さらに最終到達酢酸濃度が顕著に向上し、より高酢酸濃度の食酢を効率的に製造できることなどを見出し、本発明を完成するに至った。すなわち本発明は、以下の(1)～(9)からなるものである。

40 【0020】(1) 以下の(a)又は(b)のタンパク質。
(a)配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。
(b)配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、酢酸耐性を有するタンパク質。

45 【0021】(2) 以下の(a)又は(b)のタンパク質。
(a)配列表の配列番号4に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。
(b)配列表の配列番号4に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の欠失、置換若しくは付

加されたアミノ酸配列からなり、かつ、酢酸耐性を有するタンパク質。

【0022】(3) 以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードするDNA。

(a)配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(b)配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、酢酸耐性を有するタンパク質。

【0023】(4) 以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードするDNA。

(a)配列表の配列番号4に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(b) 配列表の配列番号4に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、酢酸耐性を有するタンパク質。

【0024】(5) 以下の(a)又は(b)の塩基配列からなるDNA。

(a)配列番号1に記載の塩基配列のうち、塩基番号301～2073からなるDNA。

(b)配列番号1に記載の塩基配列のうち、塩基番号301～2073からなる塩基配列からなるDNA又は該DNA配列の一部と相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、酢酸耐性を有するタンパク質をコードするDNA。

【0025】(6) 以下の(a)又は(b)の塩基配列からなるDNA。

(a)配列番号3に記載の塩基配列のうち、塩基番号331～2154からなるDNA。

(b)配列番号3に記載の塩基配列のうち、塩基番号331～2154からなる塩基配列からなるDNA又は該DNA配列の一部と相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、酢酸耐性を有するタンパク質をコードするDNA。

【0026】(7) (3)、(4)、(5)又は(6)に記載のDNAを細胞内に含む酢酸耐性を有する微生物又は前記酢酸耐性を有しかつ酢酸耐性が増強された微生物。

【0027】(8) 微生物がアセトバクター属、又はグルコンアセトバクター属の酢酸菌であることを特徴とする請求項(7)に記載の微生物。

【0028】(9) (7)又は(8)に記載の微生物を、アルコールを含有する培地で培養して該培地中に酢酸を生成蓄積せしめることを特徴とする食酢の製造方法。

【0029】本発明によれば、微生物に対して、酢酸に対する耐性を付与し、増強することができる。そして、アルコール酸化能を有する微生物、特に酢酸菌において

は、酢酸に対する耐性が顕著に向上し、培地中に高濃度の酢酸を効率良く蓄積する能力を付与することができる。

【0030】

05 【発明の実施の形態】以下、本発明を詳細に説明する。

(1) 本発明のDNA

本発明のDNAは、ATPバインディングカセット(ATP binding cassette)を持つなど、ABCトランスポーターのモチーフを有し、且つ酢酸耐性を向上させる機能を有する配列表配列番号2又は4に示すアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする塩基配列を包含し、該塩基配列の調製要素、及び該遺伝子の構造部分を含むものである。

【0031】本発明のDNAとして、具体的には、配列番号1の塩基番号301～2073又は配列表配列番号3の331～2154からなる塩基配列を有するDNAが挙げられる。

【0032】配列番号1又は3に示す塩基配列は、DD B J / E M B L / G e n b a n kにおいて相同遺伝子を検索したところ、大腸菌(*Escherichia coli*)のABCトランスポーター遺伝子の一つであるUUP遺伝子とアミノ酸配列レベルで38.5%、ヘモフィルス・インフルエンザエ(*Haemophilus influenzae*)のUUP遺伝子ともアミノ酸配列レベルで38.1%の相同性を示すことが分かったが、いずれも30%台の低い相同性であり、これらのタンパク質をコードする遺伝子とは異なる新規なものであることが明白であった。また、上記のUUP遺伝子は機能が不明であり、当然ながら酢酸耐性と関係していることは全く知られていない。

【0033】本発明のDNAはその塩基配列が明らかとなったので、該塩基配列に基づいて合成したオリゴヌクレオチドをプライマー1(配列番号5)及びプライマー2(配列番号6)として用い、酢酸菌、例えばアセトバクター・アルトアセチゲネスMH-24株(*Acetobacter altoacetigenes* MH-24:FERM BP-491)のゲノムDNAを鋳型としたポリメラーゼ・チェーン・リアクション(PCR反応)(トレンズ・オブ・ジェネティクス(Trends Genet.)5巻,185頁,1989年)によって、または該塩基配列に基づいて合成したオリゴヌクレオチドをプローブとして用い、前記酢酸菌のゲノムDNAライブラリーを用いるハイブリダイゼーションによっても得ることができる。

【0034】オリゴヌクレオチドの合成は、例えば、市販されている種々のDNA合成機を用いて定法に従って合成できる。また、PCR反応は、アプライドバイオシステムズ社(Applied Biosystems)製のサーマルサイクラーGeneAmp2400を用い、TaqDNAポリメラーゼ(宝酒造社製)を使用して、定法に従って行うことができる。

50 【0035】本発明の酢酸耐性を増強する機能を有する

タンパク質をコードするDNAは、コードされるタンパク質の酢酸耐性又は該酢酸耐性を増強する機能が損なわれない限り、1又は複数の位置で1又は数個のアミノ酸が置換、欠失又は付加されたタンパク質をコードするものであっても良い。

【0036】このような酢酸耐性を増強する機能を有するタンパク質と実質的に同一のタンパク質をコードするDNAは、例えば部位特異的変異法によって、特定の部位のアミノ酸が欠失、置換又は付加されるように塩基配列を改変することによっても取得され得る。また、上記のような改変されたDNAは、従来知られている突然変異処理によっても取得することができる。

【0037】また、一般的にタンパク質のアミノ酸配列およびそれをコードする塩基配列は、種間、株間、変異体、変種間でわずかに異なることが知られているので、実質的に同一のタンパク質をコードするDNAは、酢酸菌全般、中でもアセトバクター属やグルコンアセトバクター属の種、株、変異体、変種から得ることが可能である。

【0038】具体的には、アセトバクター属やグルコンアセトバクター属に属する酢酸菌、又は変異処理したアセトバクター属やグルコンアセトバクター属に属する酢酸菌、これらの自然変異株若しくは変種から、例えば配列番号1に記載の塩基配列のうち、塩基配列番号301～2073からなる塩基配列を有するDNAや該塩基配列の一部を有するDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつATPバインディングカセットを有し、酢酸耐性又は該酢酸耐性を増強する機能を有するタンパク質をコードするDNAを単離することによっても、該タンパク質と実質的に同一のタンパク質をコードするDNAが得られる。

【0039】ここでいうストリンジェントな条件とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。この条件を明確に数値化することは困難であるが、一例を示せば、相溶性が高い核酸同士、例えば70%以上の相溶性を有するDNA同士がハイブリダイズし、それより相溶性が低い核酸同士がハイブリダイズしない条件、あるいは通常のハイブリダイゼーションの洗浄条件、例えば1×SSCで0.1% SDSに相当する塩濃度で60℃で洗浄が行われる条件などが挙げられる。

【0040】(2) 本発明の酢酸菌

本発明の酢酸菌はアセトバクター属及びグルコンアセトバクター属に属する細菌をさし、酢酸耐性が増強されたアセトバクター属の細菌及びグルコンアセトバクター属の細菌、または酢酸耐性が低下したアセトバクター属の細菌及びグルコンアセトバクター属の細菌である。

【0041】アセトバクター属の細菌として、具体的にはアセトバクター・アセチ (*Acetobacter aceti*) が挙

げられ、アセトバクター・アセチ No. 1023 (*Acetobacter aceti* No.1023) 株 (特許生物寄託センターにFERM BP-2287として寄託) が例示される。

- 05 【0042】また、グルコンアセトバクター属の細菌としては、グルコンアセトバクター・エンタニイ (*Gluconacetobacter entanii*) が挙げられ、アセトバクター・アルトアセチゲネスMH-24 (*Acetobacter altoacetigenes* MH-24) 株 (特許生物寄託センターにFERM BP-491として寄託) が例示される。

- 10 【0043】酢酸耐性の増強は、例えば酢酸耐性遺伝子の細胞内のコピー数を増幅すること、又は、該遺伝子の構造遺伝子を含むDNA断片をアセトバクター属の酢酸菌の中で効率よく機能するプロモーター配列に連結して得られる組換えDNAを用いて、アセトバクター属酢酸菌を形質転換することによって増強することができる。

- 15 【0044】また、染色体DNA上の該遺伝子のプロモーター配列を、アセトバクター属やグルコンアセトバクター属の酢酸菌中で効率よく機能する他のプロモーター配列、例えば大腸菌のプラスミドpBR322 (宝酒造社製) のアンピシリン耐性遺伝子、プラスミドpHSG298 (宝酒造社製) のカナマイシン耐性遺伝子、プラスミドpHSG396 (宝酒造社製) のクロラムフェニコール耐性遺伝子、β-ガラクトシダーゼ遺伝子などの各遺伝子のプロモーターなどの酢酸菌以外の微生物由来のプロモーター配列に置き換えることによっても、酢酸耐性を増強することができる。

- 20 【0045】該遺伝子の細胞内コピー数の増幅は、該遺伝子を持するマルチコピーベクターをアセトバクター属酢酸菌の細胞に導入することによって行なうことができる。すなわち、該遺伝子を持するプラスミド、トランスポゾン等をアセトバクター属やグルコンアセトバクター属の酢酸菌の細胞に導入することによって行なうことができる。

- 30 【0046】マルチコピーベクターとしては、pMV24 (アプライド・オブ・エンバイロメト・アンド・マイクロバイオロジー (Appl. Environ. Microbiol.) 55巻, 171頁, 1989年) やpTA5001(a)、pTA5001(b) (特開昭60-9488号公報) などが挙げられ、染色体組み込み型ベクターであるpMVL1 (アグリカルチュラル・アンド・バイオロジカル・ケミストリー (Agric. Biol. Chem.) 52巻, 3125頁, 1988年) も挙げられる。また、トランスポゾンとしては、MuやIS1452などが挙げられる。

- 40 【0047】アセトバクター属やグルコンアセトバクター属の酢酸菌へのDNAの導入は、塩化カルシウム法 (アグリカルチュラル・アンド・バイオロジカル・ケミストリー (Agric. Biol. Chem.) 49巻, p.2091, 1985年) やエレクトロポレーション法 (バイオサイエンス・バイオテクノロジー・アンド・バイオケミ

トリー (Biosci. Biotech. Biochem.)、58巻、974頁、1994年)等によって行うことができる。

【0048】アルコール酸化能を有するアセトバクター属やグルコンアセトバクター属の酢酸菌において、上記のようにしてその酢酸耐性を増強すると、酢酸の生産量や生産効率を増大させることができる。

【0049】該遺伝子を破壊して酢酸耐性を低下させたアセトバクター属やグルコンアセトバクター属の酢酸菌は、例えば、該遺伝子の一部を破壊して不完全な形にした遺伝子を有するDNA断片を該微生物に導入し、該微生物の染色体上の該遺伝子との相同組換えにより、染色体DNAに不完全な形の遺伝子を組み込むことにより得ることができる。

【0050】具体的には、例えば、該遺伝子内部にカナマイシン等の薬剤に耐性を示すマーカー遺伝子を挿入して組換えDNAを調製し、この組換えDNAでアセトバクター属やグルコンアセトバクター属の酢酸菌を形質転換し、カナマイシン等の薬剤を含む培地で培養することにより、組換えDNAが染色体DNAに組み込まれた形質転換株が得られる。こうして染色体に組換えDNAが組み込まれた株は、染色体上に元々存在する該遺伝子配列との組換えを起こし、染色体上の該遺伝子が薬剤マーカー遺伝子を挿入した不完全な形の該遺伝子と入れ替わったものである。

【0051】(3) 食酢製造法

上記のようにして、酢酸耐性遺伝子のコピー数が増幅されたことにより酢酸耐性が選択的に増強されたアセトバクター属やグルコンアセトバクター属の酢酸菌であって、アルコール酸化能を有するものをアルコール含有培地で培養し、該培地中に酢酸を生産蓄積せしめることにより、食酢を効率よく製造することができる。

【0052】本発明の製造法における酢酸発酵は、従来の酢酸菌の発酵法による食酢の製造法と同様にして行なえば良い。酢酸発酵に使用する培地としては、炭素源、窒素源、無機物、エタノールを含有し、必要があれば使用菌株が生育に要求する栄養源を適量含有するものであれば、合成培地でも天然培地でも良い。

【0053】炭素源としては、グルコースやシュクロースをはじめとする各種炭水化物、各種有機酸が挙げられる。窒素源としては、ペプトン、発酵菌体分解物などの天然窒素源を用いることができる。

【0054】また、培養は、静置培養法、振盪培養法、通気攪拌培養法等の好気的条件下で行ない、培養温度は通常30℃で行なう。培地のpHは通常2.5～7の範囲であり、2.7～6.5の範囲が好ましく、各種酸、各種塩基、緩衝液等によって調製することもできる。通常1～21日間の培養によって、培地中に高濃度の酢酸が蓄積する。以下に、本発明を実施例により具体的に説明する。

【0055】

【実施例】 (実施例1) アセトバクター・アセチの酢酸耐性遺伝子のクローニングと該遺伝子の塩基配列及びアミノ酸配列の決定

(1) 酢酸耐性遺伝子のクローニング

- 05 アセトバクター・アセチNo. 1023 (Acetobacter aceti No.1023) 株 (FERM BP-2287) を1%の酢酸を含むYPG培地 (3%グルコース、0.5%酵母エキス、0.2%ポリペプトン) を用いて、30℃で24時間振盪培養した。培養後、培養液を遠心分離 (7,500×g、10分) して菌体を得た。また、酢酸を含まないYPG培地でも、同様にして培養して、菌体を得た。

- 15 【0056】得られたこれらの菌体を、それぞれソニケーションにより破碎し、その菌体破碎液を遠心分離 (12,000×g、10分間) して得られた上澄液を、さらに超遠心分離 (400,000×g、1時間) を行なうことによって沈殿物 (不溶性蛋白質) を得た。その後、この沈殿物を50mMリン酸緩衝液 (pH7.5) に懸濁した。

- 20 【0057】この懸濁した沈殿物を2×SDS-PAGE泳動緩衝液 (0.125M Tris-HCl (pH 6.8)、10%2-Mercaptoethanol、4%SDS、10%Sucrose、0.004%Bromophenol blue) に1:1の比率で懸濁し、沸騰水浴中で3分間加熱処理した。このサンプルをSDS-PAGE電気泳動した後、CBB染色し、1%の酢酸を含むYPG培地で生育したものと、酢酸を含まないYPG培地で生育したものとを比較しところ、分子量約70kDaのバンドが1%酢酸を含む培地で生育したもので発現が増幅しているのが確認された。

- 30 【0058】このように発現が増幅していたバンドをPVDF膜に転写し、アミノ末端のアミノ酸配列をプロテインシーケンサーにて決定した。決定したアミノ酸配列はMet-Ala-His-Pro-Pro-Leu-Leu-His-Leuであった。

- 35 【0059】上記のアミノ酸配列を基にしてオリゴヌクレオチドを合成し、これをアセトバクター・アセチNo. 1023株から定法により染色体DNAを抽出し制限酵素Pst Iで完全分解したのに対して、サザンハイブリダイゼーションを行なった。

- 40 【0060】その結果、約2.5kbpの位置にポジティブなバンドを確認した。このバンドをアガロースゲルより抽出し、大腸菌ベクターpUC19の制限酵素Pst I切断部位にライゲーションし、大腸菌JM109株に形質転換し、100μg/mlのアンピシリンを含むLB寒天培地で選択した。出現したコロニーをサザンハイブリダイゼーションで用いたと同じオリゴヌクレオチドをプローブとし、コロニーハイブリダイゼーションを行ない、ポジティブな形質転換体を単離した。

- 50 【0061】その後、プラスミドDNAをポジティブな

形質転換体より分離し、挿入断片の構造を制限酵素マッピングにより解析し、その結果、図1に示した約2.5 kbpのPst I断片を確認した。

【0062】(2) クローン化された遺伝子断片の塩基配列の決定

上記挿入断片の大部分について、塩基配列をサンガーのダイデオキシ・チェーン・ターミネーション法によって決定した。塩基配列の決定は、両方のDNA鎖の全領域について行ない、切断点は全てオーバーラップする様にして行なった。その結果、配列番号1に記載した塩基配列が決定された。

【0063】配列番号1記載の塩基配列中には、塩基番号301から塩基番号2073にかけて、配列番号2に記載したような591個のアミノ酸をコードするオープンリーディング・フレームの存在が確認された。配列番号2に記載のタンパク質のN末端側のアミノ酸配列はMet-Ala-His-Pro-Pro-Leu-Leu-His-Leuであり、先に決定した該タンパク質のN末端側のアミノ酸配列と完全に一致することが確認された。

【0064】また、配列番号2に記載のアミノ酸配列のタンパク質には、ATPバインディングカセットをアミノ酸番号39~46と314~321の2個所に持つなど、ABCトランスポーターのモチーフを有していることが確認された。

【0065】(実施例2) グルコンアセトバクター・エンタニイからの酢酸耐性遺伝子のクローニングと塩基配列及びアミノ酸配列の決定

(1) 染色体DNAライブラリーの作製

グルコンアセトバクター・エンタニイ (*Gluconacetobacter entanii*) の1菌株であるアセトバクター・アルトアセトゲネスMH-24 (*Acetobacter altoacetigenes* MH-24) 株 (FERM BP-491) を6%酢酸、4%エタノールを添加したYPG培地 (3%グルコース、0.5%酵母エキス、0.2%ポリペプトン) で30℃にて振盪培養を行なった。培養後、培養液を遠心分離 (7,500×g、10分) し、菌体を得た。得られた菌体より、特開昭60-9489号公報に開示された方法により、染色体DNAを調製した。

【0066】上記のようにして得られた染色体DNA及び酢酸一大腸菌シャトルベクターpMV24 (アプライド・オブ・エンバイロメント・アンド・マイクロバイオロジー (Appl. Environ. Microbiol.) 55巻、171頁、1989年) を、制限酵素EcoRI (宝酒造社製) で切断した。これらのDNAを適量ずつ混合し、ライゲーションキット (TaKaRa DNA Ligation Kit Ver. 2, 宝酒造社製) を用いて連結してグルコンアセトバクター・エンタニイの染色体DNAライブラリーを構築した。

【0067】(2) 酢酸耐性遺伝子のクローニング

上記のようにして得られたグルコンアセトバクター・エンタニイの染色体DNAライブラリーを、通常は酢酸濃度1%程度までしか増殖出来ないアセトバクター・アセチNo. 1023株にエレクトロポレーション法 (パイオサイエンス・バイオテクノロジー・アンド・バイオケミストリー (Biosci. Biotech. Biochem.) 58巻、974頁、1994年) で形質転換し、2%酢酸、100 µg/mlのアンプシリンを含むYPG寒天培地にて、30℃で4日間培養した。

【0068】生じたコロニーを100 µg/mlのアンプシリンを含むYPG培地に接種して培養し、得られた菌体からプラスミドを回収したところ、約3.5 kbpのEcoRI断片がクローン化されており、該断片の構造を制限酵素マッピングにより解析し、その結果を図2に示した。また、クローン化されたDNA断片のうち、アセトバクター・アセチNo. 1023株を2%酢酸を含むYPG培地で生育可能にする断片は、SphI-EcoRI断片であった。

【0069】このようにして通常は酢酸濃度1%程度までしか増殖出来ないアセトバクター・アセチNo. 1023株を2%酢酸含有培地でも増殖可能にする上記SphI-EcoRI断片からなる酢酸耐性遺伝子断片を取得した。

【0070】(3) クローン化されたDNA断片の塩基配列の決定

実施例1と同様に、酢酸耐性遺伝子を含有する断片の塩基配列をサンガーのダイデオキシ・チェーン・ターミネーション法によって決定した。その結果、配列番号3に記載した塩基配列が決定された。アセトバクター・アセチNo. 1023株の場合と同様に、配列決定は両方のDNA鎖の全領域について行ない、切断点は全てオーバーラップする様にして行なった。

【0071】配列番号3記載の塩基配列中には、塩基番号331から塩基番号2154にかけて、配列番号4に記載したような608個のアミノ酸をコードするオープンリーディング・フレームの存在が確認された。配列番号4に記載のアミノ酸配列のタンパク質には、ATPバインディングカセットのモチーフをアミノ酸番号41~48と319~326の2個所に有していた。

【0072】(実施例3) 相同組換えで酢酸耐性遺伝子を破壊させた遺伝子破壊株の造成と該遺伝子破壊株の酢酸耐性の特異的な低下

(1) 相同組換えによる遺伝子破壊株の造成
アセトバクター・アセチNo. 1023株の酢酸耐性を増強する機能を有するタンパク質をコードする遺伝子の破壊を目的として、図1に示すPst I断片をベクターpUC18のPst I切断部位へ組み込んだ組換えプラスミドpUCM181を構築した後、このpUCM181の酢酸耐性遺伝子 (Acetic acid resistance gene) の中に存在するEcoRV切断部位に、プラスミドpH

SD298 (ジーン (Gene), 61巻, 63頁, 1987年) のカナマイシン耐性遺伝子を含むEcoRV断片を組み込んだ組換えプラスミドpUCMK181を構築した。

【0073】このようにして構築したpUCMK181を、アセトバクター・アセチNo. 1023株にエレクトロポレーション法 (バイオサイエンス・バイオテクノロジー・アンド・バイオケミストリー (Biosci. Biotech. Biochem.), 58巻, 974頁, 1994年) で形質転換し、形質転換株をカナマイシン50 μ g/mlを含むYPG寒天培地 (グルコース3%, 酵母エキス0.5%, ポリペプトン0.2%, 寒天2%, pH6.5) で選択した。

【0074】選択培地で増殖したカナマイシン耐性株から定法に従って染色体DNAを抽出し、制限酵素PstIで切断した後、酢酸耐性遺伝子を含むPstI断片とカナマイシン耐性遺伝子を含むEcoRV断片をプローブとしたサザンハイブリダイゼーションを行なった。その結果、カナマイシン耐性株の酢酸耐性遺伝子内にカナマイシン耐性遺伝子断片 (1.67kbp) が挿入され、酢酸耐性遺伝子が破壊された酢酸耐性遺伝子破壊株が確認された。

【0075】(2) 酢酸耐性遺伝子破壊株の有機酸耐性上記で得られたカナマイシン耐性株、すなわち酢酸耐性遺伝子破壊株について、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、酪酸の有機酸に対する感受性を調べた。酢酸耐性遺伝子破壊株を50 μ g/mlのカナマイシンを添加したYPG培地で、またその元株であるアセトバクター・アセチNo. 1023株はカナマイシン無添加のYPG培地で、30℃で24時間培養して得た培養液を、1.5%の酢酸、0.02%のギ酸、0.1%のプロピオン酸、または0.1%の酪酸を添加した各YPG培地にそれぞれ1%ずつ植菌し、また有機酸無添加のYPG培地にもそれぞれ1%ずつ植菌した後、30℃にて振盪培養して増殖状況を比較した。増殖は660nmにおける吸光度で測定した。

【0076】結果を図3に示したが、酢酸以外の有機酸では、該遺伝子破壊株は元株アセトバクター・アセチNo. 1023株とほぼ同等の増殖を示したが、酢酸を添加した時のみ、該遺伝子破壊株において増殖誘導期の遅延や増殖の低下が認められ、該遺伝子は酢酸に特異的な耐性に関与することが確認できた。

【0077】(実施例4) アセトバクター・アセチ由来の酢酸耐性遺伝子で形質転換した形質転換株での酢酸耐性の増強

(1) アセトバクター・アセチへの形質転換
アセトバクター・アセチNo. 1023株由来の酢酸耐性遺伝子を酢酸菌一大腸菌シャトルベクターpMV24

(アプライド・オブ・エンバイロメント・アンド・マイクロバイオロジー (Appl. Environ. Microbiol.) 55巻, 171頁, 1989年) の制限酵素PstI切断部位に挿入したプラスミドpABC1を作製した。

【0078】このpABC1をアセトバクター・アセチNo. 1023株にエレクトロポレーション法 (バイオサイエンス・バイオテクノロジー・アンド・バイオケミストリー (Biosci. Biotech. Biochem.), 58巻, 974頁, 1994年) によって形質転換した。形質転換株は100 μ g/mlのアンピシリン及び2%の酢酸を添加したYPG寒天培地で選択した。

【0079】選択培地上で生育したアンピシリン耐性の形質転換株は、定法によりプラスミドを抽出して解析し、酢酸耐性遺伝子を保有するプラスミドを保持していることを確認した。

【0080】(2) 形質転換株の酢酸耐性
上記のようにして得られたプラスミドpABC1を有するアンピシリン耐性の形質転換株について、酢酸を添加したYPG培地での生育を、シャトルベクターpMV24のみを導入した元株アセトバクター・アセチNo. 1023株と比較した。

【0081】具体的には、酢酸3%、エタノール3%、アンピシリン100 μ g/mlを含む100mlのYPG培地にて、30℃で振盪培養 (150rpm) を行ない、形質転換株と元株の酢酸添加培地での増殖を660nmにおける吸光度を測定することで比較した。

【0082】その結果、図4に示すように、形質転換株では3%酢酸と3%エタノールを添加した培地でも比較的短い誘導期の後に旺盛な増殖が可能であったのに対して、元株アセトバクター・アセチNo. 1023株では誘導期が非常に長く、また増殖も比較的弱いことが確認でき、酢酸耐性遺伝子の酢酸耐性増強機能が確認できた。

【0083】(実施例5) アセトバクター・アセチ由来の酢酸耐性遺伝子で形質転換した形質転換株の酢酸発酵試験

実施例4で得られたプラスミドpABC1を有するアンピシリン耐性の形質転換株について、シャトルベクターpMV24のみを有する元株アセトバクター・アセチNo. 1023株と酢酸醗酵能を比較した。

【0084】具体的には、5Lのミニジャー (エイブル社製; BMS-05) を用いて、酢酸4%、エタノール3%、アンピシリン100 μ g/mlを含む2LのYPG培地にて、30℃、300rpm、0.15vvmの通気攪拌培養を行ない、形質転換株と元株の酢酸発酵能を比較した。その結果を表1にまとめた。

【0085】

【表1】

| | 最終到達酢酸 濃度 (%) | 比増殖速度 (OD660/h r) | 生産速度 (%/h r) | 増殖誘導期 (h r) |
|-------|------------------|----------------------|-----------------|----------------|
| 元株 | 8.4 | 0.0057 | 0.014 | 190 |
| 形質転換株 | 10.6 | 0.0097 | 0.026 | 160 |

【0086】表1の結果から、形質転換株の方が、最終到達酢酸濃度、比増殖速度、生産速度、増殖誘導期の何れにおいても、顕著に優れていることが確認できた。

【0087】(実施例6) グルコンアセトバクター・エンタニイ由来の酢酸耐性遺伝子で形質転換した形質転換株での酢酸耐性の増強

(1) セトバクター・アセチへの形質転換

グルコンアセトバクター・エンタニイの1菌株であるアセトバクター・アルトアセチゲネスMH-24株由来の酢酸耐性遺伝子を含む遺伝子断片をPCR法により増幅し、その結果得られた増幅断片をBamHI、EcoRIで切断し、この断片を酢酸菌一大腸菌シャトルベクターpMV24 (アプライド・オブ・エンバイロメント・アンド・マイクロバイオロジー (Appl. Environ. Microbiol.) 55巻, 171頁, 1989年) の制限酵素BamHI-EcoRI切断部位に挿入したプラスミドpABC11を作製した。

【0088】PCR法は具体的には次のようにして実施した。すなわち、鋳型としてアセトバクター・アセチゲネスMH-24株のゲノムDNAを用い、プライマーとしてプライマー1 (配列番号5) 及びプライマー2 (配列番号6) を用いて、KOD-Plus- (東洋紡績社製) を使用し、下記するPCR条件にてPCRを実施した。(PCR条件) 94℃ 15秒、60℃ 30秒、68℃ 2分を1サイクルとして、30サイクル実施した。

【0089】このpABC11をアセトバクター・アセチNo. 1023株にエレクトロポレーション法 (バイオサイエンス・バイオテクノロジー・アンド・バイオケミストリー (Biosci. Biotech. Biochem.), 58巻, 974頁, 1994年) によって形質転換した。形質転換株は100 µg/mlのアンピシリン及び2%の酢酸

を添加したYPG寒天培地で選択した。

【0090】選択培地上で生育したアンピシリン耐性の形質転換株は、定法によりプラスミドを抽出して解析し、酢酸耐性遺伝子を保有するプラスミドを保持していることを確認した。

【0091】(2) 形質転換株の酢酸耐性

上記のようにして得られたプラスミドpABC11を有するアンピシリン耐性の形質転換株について、酢酸を添加したYPG培地での生育を、シャトルベクターpMV24のみを導入した元株アセトバクター・アセチNo. 1023株と比較した。

【0092】具体的には、酢酸3%、エタノール3%、アンピシリン100 µg/mlを含む100mlのYPG培地にて、30℃で振盪培養 (150 rpm) を行ない、形質転換株と元株の酢酸添加培地での生育を660 nmにおける吸光度を測定することで比較した。

【0093】その結果、図5に示すように、形質転換株では3%酢酸と3%エタノールを添加した培地でも比較的短い誘導期の後に旺盛な増殖が可能であったのに対して、元株アセトバクター・アセチNo. 1023株では誘導期が非常に長く、また増殖も比較的弱いことが確認でき、酢酸耐性遺伝子の酢酸耐性増強機能が確認できた。

【0094】

【発明の効果】本発明により、酢酸耐性に関与する新規な遺伝子が提供され、さらに該遺伝子を用いてより高酢酸濃度の食酢を高効率で製造可能な育種株を取得することができ、該育種株を用いたより高酢酸濃度の食酢を高効率で製造する方法が提供できた。

【0095】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Mitsukan Group Corporation
 <120> Acetic acid resistance gene, acetic acid bacteria transformed with said gene, and the method for producing vinegar using said acetic acid bacteria
 <130> P02-0012
 <140>
 <141>
 <160> 6
 <170> PatentIn Ver. 2.0
 <210> 1
 <211> 2414
 <212> DNA

<213> Acetobacter aceti

<220>

<221> CDS

05

<222> (301)..(2073)

<400> 1

```

gctcgcgtac cgggcgwtc ctctagagtc atcaaccttg gccaggtgg ggatggcata 60
caggcggtgg cgaaattac ctcattttc agtgtgccgg ttatatacgt aacggcgat 120
ccagaacgtt tgctaactgg ggaacatg gagcccagtt ttgttattac caagccgttt 180
gaccccccta ccttctgtgt tgcaacgtat caggcagtaa gcagcgacg cacacaggcc 240
gtataagcaa aaaagcgccc tccatttcca gttctacaaa acgattatt ttttccagc 300
atg gcg cat cct ccc ctt ctt cat ctt cag gac att act ctt tca tta 348
Met Ala His Pro Pro Leu Leu His Leu Gln Asp Ile Thr Leu Ser Leu
      1           5           10          15
gga ggg aac ccg ctg ctg gat ggc gcc ggt ttt gcc gtt ggg cgt ggt 396
Gly Gly Asn Pro Leu Leu Asp Gly Ala Gly Phe Ala Val Gly Arg Gly
      20          25          30
gag cgc ctc tgc ctt gtg ggg cga aac ggt tgc gga aag tcc acc ctg 444
Glu Arg Leu Cys Leu Val Gly Arg Asn Gly Ser Gly Lys Ser Thr Leu
      35          40          45
ctc aaa att gct gcg ggt gtt att cag cca gat tgc ggg tct gtg ttt 492
Leu Lys Ile Ala Ala Gly Val Ile Gln Pro Asp Ser Gly Ser Val Phe
      50          55          60

gtc cag ccc ggt gct tcc ctg cgc tat ctg ccg cag gag ccg gat tta 540
Val Gln Pro Gly Ala Ser Leu Arg Tyr Leu Pro Gln Glu Pro Asp Leu
      65          70          75          80
agc gct tat gcc aca acg gcg gat tac gtt gtg ggc cag att gga gac 588
Ser Ala Tyr Ala Thr Thr Ala Asp Tyr Val Val Gly Gln Ile Gly Asp
      85          90          95
ccg gat atg gca tgg cgc gcc acg cca ttg ctg gat gct ctg ggc ctg 636
Pro Asp Met Ala Trp Arg Ala Thr Pro Leu Leu Asp Ala Leu Gly Leu
      100         105         110
aca ggt agg gaa agc acg caa aat ctt tca ggc ggt gaa ggt cgg cgt 684
Thr Gly Arg Glu Ser Thr Gln Asn Leu Ser Gly Gly Glu Gly Arg Arg
      115         120         125
tgt gct att gct ggt gta ttg gcg gcg gcc ccc gat gtg ctg ctg ctg 732
Cys Ala Ile Ala Gly Val Leu Ala Ala Ala Pro Asp Val Leu Leu Leu
      130         135         140
gat gag ccc acc aac cat ctg gat atg cct acc att gaa tgg ttg gag 780
Asp Glu Pro Thr Asn His Leu Asp Met Pro Thr Ile Glu Trp Leu Glu
      145         150         155         160
cgt gaa ctg ctg agc ctt ggc gcc atg gta att atc agc cat gat agg 828
Arg Glu Leu Leu Ser Leu Gly Ala Met Val Ile Ile Ser His Asp Arg
      165         170         175
cgg ctg ctt tcc acc ctt tca cgt tct gtt gtg tgg ctg gat cgg ggt 876

```

50

Arg Leu Leu Ser Thr Leu Ser Arg Ser Val Val Trp Leu Asp Arg Gly
 180 185 190
 gta acc cgc agg ctt gat gaa gga ttt gga agg ttt gaa gcc tgg cga 924
 Val Thr Arg Arg Leu Asp Glu Gly Phe Gly Arg Phe Glu Ala Trp Arg
 195 200 205
 gag gag gtt ctg gaa cag gaa gag cgt gat gcg cat aaa ctg gac cgg 972
 Glu Glu Val Leu Glu Gln Glu Glu Arg Asp Ala His Lys Leu Asp Arg
 210 215 220
 aaa atc gcg cgg gaa gaa gac tgg atg cgt tat ggc gta acg gcg cgc 1020
 Lys Ile Ala Arg Glu Glu Asp Trp Met Arg Tyr Gly Val Thr Ala Arg
 225 230 235 240
 cgc aaa cgc aat gta cgc cgt gtg cgg gaa cta gca gat ttg cgc aca 1068
 Arg Lys Arg Asn Val Arg Arg Val Arg Glu Leu Ala Asp Leu Arg Thr
 245 250 255
 gcc cgt aag gag gcc att cgg gca ccc ggc acc ctt acc ttg aac acg 1116
 Ala Arg Lys Glu Ala Ile Arg Ala Pro Gly Thr Leu Thr Leu Asn Thr
 260 265 270
 cag ctg cgg cca cat cgc aag ctg gtg gct gtg gcc gaa gat att agt 1164
 Gln Leu Arg Pro His Arg Lys Leu Val Ala Val Ala Glu Asp Ile Ser
 275 280 285
 aag gca tgg ggt gaa aag cag gtt gtt cgc cat ttg gac ctg cgc att 1212
 Lys Ala Trp Gly Glu Lys Gln Val Val Arg His Leu Asp Leu Arg Ile

 290 295 300
 tta cgt gga gac cgg ctt ggt att gtg ggg gcc aat ggt gca ggc aaa 1260
 Leu Arg Gly Asp Arg Leu Gly Ile Val Gly Ala Asn Gly Ala Gly Lys
 305 310 315 320
 acc aca ttg ttg cgg atg cta aca ggg ctg gac caa ccc gat agt ggc 1308
 Thr Thr Leu Leu Arg Met Leu Thr Gly Leu Asp Gln Pro Asp Ser Gly
 325 330 335
 aca atc tca ctt ggt cct tcc ctt aat atg gtc acg ctg gat cag cag 1356
 Thr Ile Ser Leu Gly Pro Ser Leu Asn Met Val Thr Leu Asp Gln Gln
 340 345 350
 cga cgt acc ctg aac ccg gaa cgc aca cta gcc gat acc ttg aca gaa 1404
 Arg Arg Thr Leu Asn Pro Glu Arg Thr Leu Ala Asp Thr Leu Thr Glu
 355 360 365
 ggc gga ggc gat atg gtg cag gtt ggc acg gaa aag cgc cac gtt gtg 1452
 Gly Gly Gly Asp Met Val Gln Val Gly Thr Glu Lys Arg His Val Val
 370 375 380
 ggg tat atg aaa gac ttt ctg ttt cgg cca gaa cag gca cgc aca ccc 1500
 Gly Tyr Met Lys Asp Phe Leu Phe Arg Pro Glu Gln Ala Arg Thr Pro
 385 390 395 400
 gta agt gcc ctt tct ggc ggg gag cga ggg cgg tta atg ctg gca tgc 1548
 Val Ser Ala Leu Ser Gly Gly Glu Arg Gly Arg Leu Met Leu Ala Cys
 405 410 415

 gca ttg gcc aag ccc tcc aac ctg ctg gtg ctg gat gaa ccc acc aat 1596

Ala Leu Ala Lys Pro Ser Asn Leu Leu Val Leu Asp Glu Pro Thr Asn
 420 425 430
 gat ctg gat ctg gaa aca ctg gat att ttg caa gac atg ctc gcc agt 1644
 Asp Leu Asp Leu Glu Thr Leu Asp Ile Leu Gln Asp Met Leu Ala Ser
 435 440 445
 tgt gaa ggc aca gtg ctg ctt gta agc cat gat cgt gat ttt ctg gat 1692
 Cys Glu Gly Thr Val Leu Leu Val Ser His Asp Arg Asp Phe Leu Asp
 450 455 460
 cgg gtt gca aca tcc gtc ttg gcg aca gag gga gat ggc aac tgg ata 1740
 Arg Val Ala Thr Ser Val Leu Ala Thr Glu Gly Asp Gly Asn Trp Ile
 465 470 475 480
 gaa tat gct ggc gga tac agt gac atg ctg gct cag cgg cac cag aaa 1788
 Glu Tyr Ala Gly Gly Tyr Ser Asp Met Leu Ala Gln Arg His Gln Lys
 485 490 495
 ccg ttg aca acg gcc tct gtg gtg gaa aac gaa ccc aca aaa ccc aaa 1836
 Pro Leu Thr Thr Ala Ser Val Val Glu Asn Glu Pro Thr Lys Pro Lys
 500 505 510
 gag aca act gct gcg cgt ggc ccg acc aaa aag ctg agt tat aag gac 1884
 Glu Thr Thr Ala Ala Arg Gly Pro Thr Lys Lys Leu Ser Tyr Lys Asp
 515 520 525

cag ttt gcg ctg gat aat ctg ccc aag gaa atg gaa aag ctg gaa gca 1932
 Gln Phe Ala Leu Asp Asn Leu Pro Lys Glu Met Glu Lys Leu Glu Ala
 530 535 540
 cag gct gcc aac tgc gtg aaa aac tgg cag atc cag att tat atg gaa 1980
 Gln Ala Ala Asn Cys Val Lys Asn Trp Gln Ile Gln Ile Tyr Met Glu
 545 550 555 560
 aaa acc ccg cgc agt ttg aga aac ttt cgg ctg att tac aga agc tcg 2028
 Lys Thr Pro Arg Ser Leu Arg Asn Phe Arg Leu Ile Tyr Arg Ser Ser
 565 570 575
 aaa caa agc tgg cag aat ctg aag aac gct ggc tgg aac tgg aaa 2073
 Lys Gln Ser Trp Gln Asn Leu Lys Asn Ala Gly Trp Asn Trp Lys
 580 585 590
 tgaagcgaga agccctacag gccactaag gcaacgctat ttttcggtga accgcactct 2133
 tgcaggcggg tgggtgcaat gcctatgttt tggcatgctc tgttttactg gttctcttta 2193
 taagcgcacc cttctgctg gcagtctggc attgcttgcc tttctgagcg tggcacacat 2253
 tgcattcgcg caggatadac ccgccgctgc agtctcccta tagtgagtog tattacgcgt 2313
 tctaacgaat ccatatgact wtgtagaccc tctagagtcg acctgcaggc atgcaagctt 2373
 yccctatagt gagtcgtatt agagcttggc gtaatgcatg a 2414

<210> 2

<211> 591

<212> PRT

<213> Acetobacter aceti

<400> 2

Met Ala His Pro Pro Leu Leu His Leu Gln Asp Ile Thr Leu Ser Leu
 1 5 10 15
 Gly Gly Asn Pro Leu Leu Asp Gly Ala Gly Phe Ala Val Gly Arg Gly

20 25 30
 Glu Arg Leu Cys Leu Val Gly Arg Asn Gly Ser Gly Lys Ser Thr Leu
 35 40 45
 Leu Lys Ile Ala Ala Gly Val Ile Gln Pro Asp Ser Gly Ser Val Phe
 50 55 60
 Val Gln Pro Gly Ala Ser Leu Arg Tyr Leu Pro Gln Glu Pro Asp Leu
 65 70 75 80
 Ser Ala Tyr Ala Thr Thr Ala Asp Tyr Val Val Gly Gln Ile Gly Asp
 85 90 95
 Pro Asp Met Ala Trp Arg Ala Thr Pro Leu Leu Asp Ala Leu Gly Leu
 100 105 110
 Thr Gly Arg Glu Ser Thr Gln Asn Leu Ser Gly Gly Glu Gly Arg Arg
 115 120 125
 15
 Cys Ala Ile Ala Gly Val Leu Ala Ala Ala Pro Asp Val Leu Leu Leu
 130 135 140
 Asp Glu Pro Thr Asn His Leu Asp Met Pro Thr Ile Glu Trp Leu Glu
 145 150 155 160
 Arg Glu Leu Leu Ser Leu Gly Ala Met Val Ile Ile Ser His Asp Arg
 165 170 175
 Arg Leu Leu Ser Thr Leu Ser Arg Ser Val Val Trp Leu Asp Arg Gly
 180 185 190
 Val Thr Arg Arg Leu Asp Glu Gly Phe Gly Arg Phe Glu Ala Trp Arg
 195 200 205
 Glu Glu Val Leu Glu Gln Glu Glu Arg Asp Ala His Lys Leu Asp Arg
 210 215 220
 Lys Ile Ala Arg Glu Glu Asp Trp Met Arg Tyr Gly Val Thr Ala Arg
 225 230 235 240
 Arg Lys Arg Asn Val Arg Arg Val Arg Glu Leu Ala Asp Leu Arg Thr
 245 250 255
 Ala Arg Lys Glu Ala Ile Arg Ala Pro Gly Thr Leu Thr Leu Asn Thr
 260 265 270
 Gln Leu Arg Pro His Arg Lys Leu Val Ala Val Ala Glu Asp Ile Ser
 275 280 285
 Lys Ala Trp Gly Glu Lys Gln Val Val Arg His Leu Asp Leu Arg Ile
 290 295 300
 Leu Arg Gly Asp Arg Leu Gly Ile Val Gly Ala Asn Gly Ala Gly Lys
 305 310 315 320
 Thr Thr Leu Leu Arg Met Leu Thr Gly Leu Asp Gln Pro Asp Ser Gly
 325 330 335
 Thr Ile Ser Leu Gly Pro Ser Leu Asn Met Val Thr Leu Asp Gln Gln
 340 345 350
 Arg Arg Thr Leu Asn Pro Glu Arg Thr Leu Ala Asp Thr Leu Thr Glu
 355 360 365
 Gly Gly Gly Asp Met Val Gln Val Gly Thr Glu Lys Arg His Val Val
 370 375 380

Gly Tyr Met Lys Asp Phe Leu Phe Arg Pro Glu Gln Ala Arg Thr Pro
 385 390 395 400
 Val Ser Ala Leu Ser Gly Gly Glu Arg Gly Arg Leu Met Leu Ala Cys
 405 410 415
 Ala Leu Ala Lys Pro Ser Asn Leu Leu Val Leu Asp Glu Pro Thr Asn
 420 425 430

Asp Leu Asp Leu Glu Thr Leu Asp Ile Leu Gln Asp Met Leu Ala Ser
 435 440 445
 Cys Glu Gly Thr Val Leu Leu Val Ser His Asp Arg Asp Phe Leu Asp
 450 455 460
 Arg Val Ala Thr Ser Val Leu Ala Thr Glu Gly Asp Gly Asn Trp Ile
 465 470 475 480
 Glu Tyr Ala Gly Gly Tyr Ser Asp Met Leu Ala Gln Arg His Gln Lys
 485 490 495
 Pro Leu Thr Thr Ala Ser Val Val Glu Asn Glu Pro Thr Lys Pro Lys
 500 505 510
 Glu Thr Thr Ala Ala Arg Gly Pro Thr Lys Lys Leu Ser Tyr Lys Asp
 515 520 525
 Gln Phe Ala Leu Asp Asn Leu Pro Lys Glu Met Glu Lys Leu Glu Ala
 530 535 540
 Gln Ala Ala Asn Cys Val Lys Asn Trp Gln Ile Gln Ile Tyr Met Glu
 545 550 555 560
 Lys Thr Pro Arg Ser Leu Arg Asn Phe Arg Leu Ile Tyr Arg Ser Ser
 565 570 575
 Lys Gln Ser Trp Gln Asn Leu Lys Asn Ala Gly Trp Asn Trp Lys
 580 585 590

30

<210> 3
 <211> 2160
 <212> DNA
 <213> Gluconacetobacter entanii
 <220>
 <221> CDS
 <222> (331)..(2154)
 <400> 3

atcttgtggc caaggaattc atcgagccc aggatcctga aaatcccggc gtgctgatcc 60
 tctcccgcct tgccggggcg gcaaagcagc ttgaggccgc cctgtgtgtc aacccgctgg 120
 atcatgacgg catggccgat gcgctggaac gcgcgtggc catgtcggc gaggaacggc 180
 gcgaacgtg gcaggcatgc tggaaacgca ttgccaaccg tacggccctt ggctgggggc 240
 tgctgttctt gaacatcctt gaaaacgga agcggcggtta agccccacac cagccttgcg 300
 cacggggttg ttgagaatac ataagtgggc atg gcc tca cct ccc ctt ctt ctc 354

Met Ala Ser Pro Pro Leu Leu Leu

1

5

ctt cag gat atc acc ctg acc ctt ggc ggc gcg ccg ctg ctc aat ggc 402
 Leu Gln Asp Ile Thr Leu Thr Leu Gly Gly Ala Pro Leu Leu Asn Gly

10

15

20

gcg ggc ttc ggc gtt ggc cct ggc gag cgc gtc tgc ctt gtc ggg cgc 450
 Ala Gly Phe Gly Val Gly Pro Gly Glu Arg Val Cys Leu Val Gly Arg
 25 30 35 40
 aat ggc tgt ggc aag tcc acc ctg ctg cgc atc gcg gcg ggt gag ata 498
 Asn Gly Cys Gly Lys Ser Thr Leu Leu Arg Ile Ala Ala Gly Glu Ile
 45 50 55
 cag gcc gat gac ggc acc gtt ttt gtc cag ccc ggc acc acc gtg cgc 546
 Gln Ala Asp Asp Gly Thr Val Phe Val Gln Pro Gly Thr Thr Val Arg
 60 65 70
 tac ctg ccg cag gaa ccc gac ctg tcg ggc ttt gac acc acg ctg gat 594
 Tyr Leu Pro Gln Glu Pro Asp Leu Ser Gly Phe Asp Thr Thr Leu Asp
 75 80 85
 tac gtc cgc gcg ggc atg ggg ccg ggc gac ccg gaa tac cgc gcc gaa 642
 Tyr Val Arg Ala Gly Met Gly Pro Gly Asp Pro Glu Tyr Arg Ala Glu
 90 95 100
 ctg ctg ctg acc gaa ctg ggg ctg aac ggc acg gaa gac ccg gcc acc 690
 Leu Leu Leu Thr Glu Leu Gly Leu Asn Gly Thr Glu Asp Pro Ala Thr
 105 110 115 120
 ctg tcg ggc ggg gaa gcg ccg cgc tgc gcg ctg gcc cgc gcc ctt gcg 738
 Leu Ser Gly Gly Glu Ala Arg Arg Cys Ala Leu Ala Arg Ala Leu Ala
 125 130 135

ccc gaa ccc gac ctg ctt ttg ctg gac gaa ccc acc aac cac ctg gac 786
 Pro Glu Pro Asp Leu Leu Leu Leu Asp Glu Pro Thr Asn His Leu Asp
 140 145 150
 atg ccc acc att gaa tgg ctg gaa cgt gaa ctg ctg tcg ctg tca tcg 834
 Met Pro Thr Ile Glu Trp Leu Glu Arg Glu Leu Leu Ser Leu Ser Ser
 155 160 165
 gcc atg gtc atc ata agc cat gac cgc agg ctg ctg gaa acg ctg tcg 882
 Ala Met Val Ile Ile Ser His Asp Arg Arg Leu Leu Glu Thr Leu Ser
 170 175 180
 cgt tcg gtc gtg tgg ctg gac ccg ggt gtc acc cgc agg ctg gat cag 930
 Arg Ser Val Val Trp Leu Asp Arg Gly Val Thr Arg Arg Leu Asp Gln
 185 190 195 200
 ggc ttc gcc ccg ttc gag aca tgg cgc gag gaa gtg ctg gag cag gaa 978
 Gly Phe Ala Arg Phe Glu Thr Trp Arg Glu Glu Val Leu Glu Gln Glu
 205 210 215
 gag cgc gac agc cac aag ctg gac cgc cag atc gcg cgt gag gaa gac 1026
 Glu Arg Asp Ser His Lys Leu Asp Arg Gln Ile Ala Arg Glu Glu Asp
 220 225 230
 tgg atg cgt tac ggc gtg acc gcg ccg cgc aag cgc aat gtc cgc cgc 1074
 Trp Met Arg Tyr Gly Val Thr Ala Arg Arg Lys Arg Asn Val Arg Arg
 235 240 245
 gtg gct gaa ctg gcc gaa ctg cgc aat acc cgt cgc acc gcc ata agg 1122

| | |
|---|------|
| Val Ala Glu Leu Ala Glu Leu Arg Asn Thr Arg Arg Thr Ala Ile Arg | |
| 250 | 255 |
| cag ccc ggc ggc ctg aag atg gaa gcc cgc gaa agc gac ctg tcg ggc | 1170 |
| Gln Pro Gly Gly Leu Lys Met Glu Ala Arg Glu Ser Asp Leu Ser Gly | |
| 265 | 270 |
| aag ctg gtt gcg gtg gca gaa gat atg tca cgc gcc tat gac cct gcc | 1218 |
| Lys Leu Val Ala Val Ala Glu Asp Met Ser Arg Ala Tyr Asp Pro Ala | |
| 285 | 290 |
| cac ccg gtg gtc agc cat ctg gac ctg cgt gtc ctg cgc ggc gac cgg | 1266 |
| His Pro Val Val Ser His Leu Asp Leu Arg Val Leu Arg Gly Asp Arg | |
| 300 | 305 |
| ctg ggg atc gtg ggg gcc aat ggc gcg ggc aag agc acc ctg ctg cgc | 1314 |
| Leu Gly Ile Val Gly Ala Asn Gly Ala Gly Lys Ser Thr Leu Leu Arg | |
| 315 | 320 |
| ctg ctg acg gga ctg gac agg ccg gat tcc ggc acc atc aat atc ggc | 1362 |
| Leu Leu Thr Gly Leu Asp Arg Pro Asp Ser Gly Thr Ile Asn Ile Gly | |
| 330 | 335 |
| agc gcg ctc aat gtc gtc aca ctg gac cag cag cgc cgc tcg ctt gat | 1410 |
| Ser Ala Leu Asn Val Val Thr Leu Asp Gln Gln Arg Arg Ser Leu Asp | |
| 345 | 350 |
| ccc gac acc acg ctg gcg gat acg ctg acg ggc ggc ggc ggc gac atg | 1458 |
| Pro Asp Thr Thr Leu Ala Asp Thr Leu Thr Gly Gly Gly Gly Asp Met | |
| 365 | 370 |
| gtg cag gtt ggc aat gag aaa cgc cat gtc atc ggc tac atg aag gac | 1506 |
| Val Gln Val Gly Asn Glu Lys Arg His Val Ile Gly Tyr Met Lys Asp | |
| 380 | 385 |
| ttc ctg ttc cgc ccc gaa cag gcg cgt acc ccg gtg ggc gtg ctg tcg | 1554 |
| Phe Leu Phe Arg Pro Glu Gln Ala Arg Thr Pro Val Gly Val Leu Ser | |
| 395 | 400 |
| ggg ggc gag cgc tgg cgg ctc atg ctg gcc tgc gcg ctg gcg cgg ccg | 1602 |
| Gly Gly Glu Arg Trp Arg Leu Met Leu Ala Cys Ala Leu Ala Arg Pro | |
| 410 | 415 |
| tcc aac ctg ctg gtg ctg gac gag ccg acc aac gac ctt gac ctt gaa | 1650 |
| Ser Asn Leu Leu Val Leu Asp Glu Pro Thr Asn Asp Leu Asp Leu Glu | |
| 425 | 430 |
| acg ctc gac ctg ctg cag gac atg ctg gcc agc tat tcc ggc acg gtg | 1698 |
| Thr Leu Asp Leu Leu Gln Asp Met Leu Ala Ser Tyr Ser Gly Thr Val | |
| 445 | 450 |
| ctg ctg gtc agc cat gac cgt gac ttc ctc gac cgg gtc gcc tcc tcc | 1746 |
| Leu Leu Val Ser His Asp Arg Asp Phe Leu Asp Arg Val Ala Ser Ser | |
| 460 | 465 |
| atc ctg atg gcg gaa ggc ggc gga aag tgg gtg gaa tat gcc ggt ggc | 1794 |
| Ile Leu Met Ala Glu Gly Gly Gly Lys Trp Val Glu Tyr Ala Gly Gly | |
| 475 | 480 |
| tac agc gac atg ctg gcc cag cgg cag gac gcc aca ctg gcc gcc cgc | 1842 |

Tyr Ser Asp Met Leu Ala Gln Arg Gln Asp Ala Thr Leu Ala Ala Arg
 490 495 500
 ccc cgg cag gac cgc gcg gaa acc aca ccg gcc aga acc gat gtg acc 1890
 Pro Arg Gln Asp Arg Ala Glu Thr Thr Pro Ala Arg Thr Asp Val Thr
 505 510 515 520
 ccg tcc tcc tcc ccc cgg cag ccc gcg cgc aag atg tcg tac aag gac 1938
 Pro Ser Ser Ser Pro Arg Gln Pro Ala Arg Lys Met Ser Tyr Lys Asp
 525 530 535
 aag cac gcg ctg gaa cag cta ccc aag cag atg gcg gcg ctg gag acg 1986
 Lys His Ala Leu Glu Gln Leu Pro Lys Gln Met Ala Ala Leu Glu Thr
 540 545 550
 gaa atc gag cgc ctg cgc gcc atc ctg tcc gac ggg ggc ctg tat gcg 2034
 Glu Ile Glu Arg Leu Arg Ala Ile Leu Ser Asp Gly Gly Leu Tyr Ala
 555 560 565
 cgc gac ccc gcc acc ttt acg gcc gcc acc acg gcg ctg gaa aag gca 2082
 Arg Asp Pro Ala Thr Phe Thr Ala Ala Thr Thr Ala Leu Glu Lys Ala
 570 575 580
 gag gcc gac ctg acg gcg gcg gaa gaa cgg tgg ctg gaa ctc gaa atg 2130
 Glu Ala Asp Leu Thr Ala Ala Glu Glu Arg Trp Leu Glu Leu Glu Met
 585 590 595 600

ctg cgc gag acg ctt cag tct tcc tgaacg 2160
 Leu Arg Glu Thr Leu Gln Ser Ser
 605

<210> 4
 <211> 608
 <212> PRT
 <213> Gluconacetobacter entanii
 <400> 4

Met Ala Ser Pro Pro Leu Leu Leu Leu Gln Asp Ile Thr Leu Thr Leu
 1 5 10 15
 Gly Gly Ala Pro Leu Leu Asn Gly Ala Gly Phe Gly Val Gly Pro Gly
 20 25 30
 Glu Arg Val Cys Leu Val Gly Arg Asn Gly Cys Gly Lys Ser Thr Leu
 35 40 45
 Leu Arg Ile Ala Ala Gly Glu Ile Gln Ala Asp Asp Gly Thr Val Phe
 50 55 60
 Val Gln Pro Gly Thr Thr Val Arg Tyr Leu Pro Gln Glu Pro Asp Leu
 65 70 75 80
 Ser Gly Phe Asp Thr Thr Leu Asp Tyr Val Arg Ala Gly Met Gly Pro
 85 90 95

Gly Asp Pro Glu Tyr Arg Ala Glu Leu Leu Leu Thr Glu Leu Gly Leu
 100 105 110
 Asn Gly Thr Glu Asp Pro Ala Thr Leu Ser Gly Gly Glu Ala Arg Arg
 115 120 125

Cys Ala Leu Ala Arg Ala Leu Ala Pro Glu Pro Asp Leu Leu Leu
 130 135 140
 Asp Glu Pro Thr Asn His Leu Asp Met Pro Thr Ile Glu Trp Leu Glu
 145 150 155 160
 Arg Glu Leu Leu Ser Leu Ser Ser Ala Met Val Ile Ile Ser His Asp
 165 170 175
 Arg Arg Leu Leu Glu Thr Leu Ser Arg Ser Val Val Trp Leu Asp Arg
 180 185 190
 Gly Val Thr Arg Arg Leu Asp Gln Gly Phe Ala Arg Phe Glu Thr Trp
 195 200 205
 Arg Glu Glu Val Leu Glu Gln Glu Glu Arg Asp Ser His Lys Leu Asp
 210 215 220
 Arg Gln Ile Ala Arg Glu Glu Asp Trp Met Arg Tyr Gly Val Thr Ala
 225 230 235 240
 Arg Arg Lys Arg Asn Val Arg Arg Val Ala Glu Leu Ala Glu Leu Arg
 245 250 255

Asn Thr Arg Arg Thr Ala Ile Arg Gln Pro Gly Gly Leu Lys Met Glu
 260 265 270
 Ala Arg Glu Ser Asp Leu Ser Gly Lys Leu Val Ala Val Ala Glu Asp
 275 280 285
 Met Ser Arg Ala Tyr Asp Pro Ala His Pro Val Val Ser His Leu Asp
 290 295 300
 Leu Arg Val Leu Arg Gly Asp Arg Leu Gly Ile Val Gly Ala Asn Gly
 305 310 315 320
 Ala Gly Lys Ser Thr Leu Leu Arg Leu Leu Thr Gly Leu Asp Arg Pro
 325 330 335
 Asp Ser Gly Thr Ile Asn Ile Gly Ser Ala Leu Asn Val Val Thr Leu
 340 345 350
 Asp Gln Gln Arg Arg Ser Leu Asp Pro Asp Thr Thr Leu Ala Asp Thr
 355 360 365
 Leu Thr Gly Gly Gly Gly Asp Met Val Gln Val Gly Asn Glu Lys Arg
 370 375 380
 His Val Ile Gly Tyr Met Lys Asp Phe Leu Phe Arg Pro Glu Gln Ala
 385 390 395 400
 Arg Thr Pro Val Gly Val Leu Ser Gly Gly Glu Arg Trp Arg Leu Met

40
 405 410 415
 Leu Ala Cys Ala Leu Ala Arg Pro Ser Asn Leu Leu Val Leu Asp Glu
 420 425 430
 Pro Thr Asn Asp Leu Asp Leu Glu Thr Leu Asp Leu Leu Gln Asp Met
 435 440 445
 Leu Ala Ser Tyr Ser Gly Thr Val Leu Leu Val Ser His Asp Arg Asp
 450 455 460
 Phe Leu Asp Arg Val Ala Ser Ser Ile Leu Met Ala Glu Gly Gly Gly
 465 470 475 480
 Lys Trp Val Glu Tyr Ala Gly Gly Tyr Ser Asp Met Leu Ala Gln Arg

| | | |
|---|-----|-----|
| 485 | 490 | 495 |
| Gln Asp Ala Thr Leu Ala Ala Arg Pro Arg Gln Asp Arg Ala Glu Thr | | |
| 500 | 505 | 510 |
| Thr Pro Ala Arg Thr Asp Val Thr Pro Ser Ser Ser Pro Arg Gln Pro | | |
| 515 | 520 | 525 |
| Ala Arg Lys Met Ser Tyr Lys Asp Lys His Ala Leu Glu Gln Leu Pro | | |
| 530 | 535 | 540 |
| Lys Gln Met Ala Ala Leu Glu Thr Glu Ile Glu Arg Leu Arg Ala Ile | | |
| 545 | 550 | 555 |
| | | 560 |

| | | |
|---|-----|-----|
| Leu Ser Asp Gly Gly Leu Tyr Ala Arg Asp Pro Ala Thr Phe Thr Ala | | |
| 565 | 570 | 575 |
| Ala Thr Thr Ala Leu Glu Lys Ala Glu Ala Asp Leu Thr Ala Ala Glu | | |
| 580 | 585 | 590 |
| Glu Arg Trp Leu Glu Leu Glu Met Leu Arg Glu Thr Leu Gln Ser Ser | | |
| 595 | 600 | 605 |

<210> 5
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 223> Discription of Artificial sequence: primer
 <400> 5
 tgaacatcct tgaattcgcg aagcggcgtt

30

<210> 6
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 223> Discription of Artificial sequence: primer

<400> 6
 acggatccag gcgtccggcc tgatcat

27

【0096】

【配列表フリーテキスト】配列番号5：プライマー
 配列番号6：プライマー

【図面の簡単な説明】

【図1】Pst Iを用いてクローニングされたアセトバク
 クター・アセチ由来の遺伝子断片の制限酵素地図と酢酸
 耐性遺伝子の位置、及びpABC1への挿入断片とpU
 CMK181への挿入断片の概略図。

【図2】EcoRIを用いてクローニングされたグルコ
 ンアセトバクター・エンタニイ由来の遺伝子断片の制限

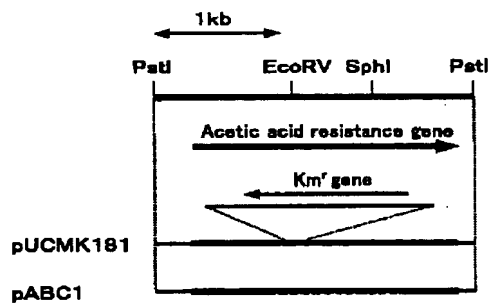
酵素地図と酢酸耐性遺伝子の位置、及びABC11への
 挿入断片の概略図。

【図3】酢酸耐性遺伝子破壊株の各種有機酸含有培地で
 の培養特性を示す図面。

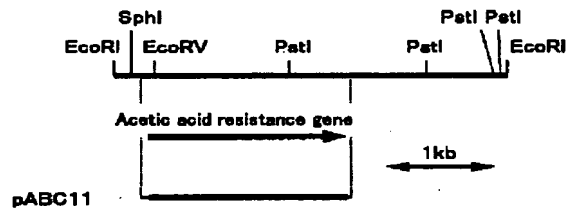
【図4】アセトバクター・アセチ由来の酢酸耐性遺伝子
 のコピー数を増幅した形質転換株の酢酸含有培地の培養
 経過を示す図面。

【図5】グルコンアセトバクター・エンタニイ由来の酢
 酸耐性遺伝子のコピー数を増幅した形質転換株の酢酸含
 有培地の培養経過を示す図面。

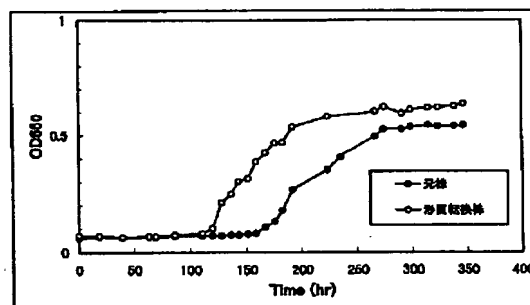
【図1】



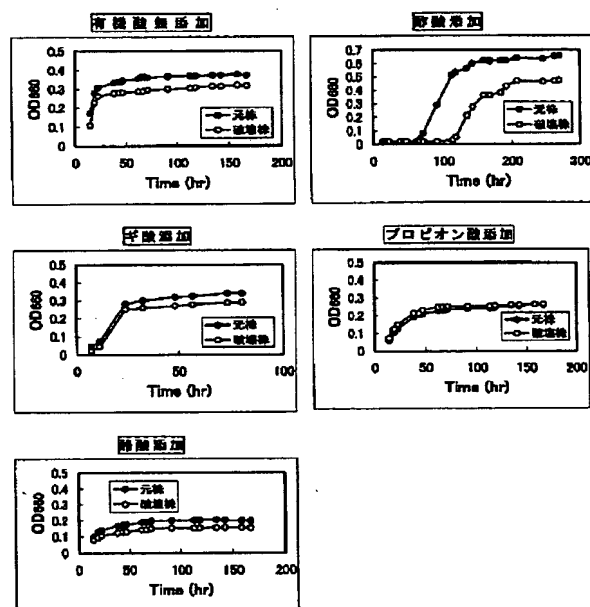
【図2】



【図4】



【図3】



【図5】

